

Andrés R. Arena

ACADEMICO DE NUMERO

TUBERCULOSIS EXPERIMENTAL

Relato hecho en la Sesión del 16 de abril de 1952

BUENOS AIRES

1958

SUMARIO

- Influencia de los experimentos de Villemin sobre el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis.
- Descubrimiento de Koch.
- Microbiología del bacilo.
- Barrera osmótica activa y pasiva.
- Falla de los métodos bacteriológicos actuales.
- Estreptomycino - resistencia.
- Sustitución de la población sensible por la resistente.
- Cultivos.
- Medios nutritivos.
- Medios nutritivos de origen vegetal
- Otros medios nutritivos.
- Infección y sobreinfección experimentales.
- Fenómenos de Charrin — Fenómenos de Koch.
- Dispersión bacilar experimental.
- Pases en serie.
- Diferenciación de cepas mediante la inoculación.
- Otros animales de experimentación.
- NOTA COMPLEMENTARIA.

Tuberculosis Experimental ⁽¹⁾

No tengo pretensión de decir ni siquiera someramente, todo lo que debiera, para corresponder al título del tema asignado. —Tampoco haré un recorrido bibliográfico ordenado de los trabajos experimentales, que han terminado con la comprobación de hechos, cuyo encañamiento ha tenido como resultado aplicaciones de indiscutible valor para la medicina práctica, con los beneficios consiguientes para la salud pública. Sólo me ocuparé de algunos puntos de la bacteriología experimental de la tuberculosis, a la que he dedicado la mayor parte de mis años de laboratorio, razón por la que me he sentido obligado a aceptar el honor que ha querido dispensarme el Comité Ejecutivo de este Congreso presidido por el distinguido fisiólogo y amigo Doctor López Bonilla.

Y al traer al recuerdo mis años de laboratorio dedicados a la bacteriología de la tuberculosis —a los que tan amablemente se ha referido esta mañana el Profesor Sayago— quiero en esta oportunidad citar especialmente aquellos que tan a mi satisfacción pasara en el primer Instituto de Fisiología del país, que creara y dirigiera dicho profesor mediante un convenio entre la Sociedad Tránsito Cáceres de Allende que presidiera la Señora Amelia López de Fernández y la Universidad Nacional de Córdoba, dirigida por el doctor Sofanor Novillo Corvalán. —En aquél Instituto, tuve todos los elementos de trabajo que necesitaba en la oportunidad, más un grupo de decididos colaboradores y en el Profesor Sayago, un director cuya comprensión

(1) En el año 1951 se realizó, en Rosario de Santa Fe, el Tercer Congreso Argentino de Fisiología, al que asistió el Señor Académico Dr. Andrés R. Arena, presentando un estudio sobre "Tuberculosis Experimental". En la sesión de la Academia, del 21 de noviembre de 1951, el Dr. Arena hizo una exposición respecto de dicho Congreso y sobre el trabajo presentado, que ahora se publica in extenso. (Nota de la Secretaría General).

hizo que gestionara para cada uno la situación que correspondía en un organismo en creación, lo que permitió que todos trabajaran con dedicación exclusiva y con entusiasmo.

Por razones ajenas a mi voluntad tuve que dejar Córdoba y en Buenos Aires ingresé, a mi solicitud, en la Cátedra de Clínica y Patología de la Tuberculosis, encontrando en el Profesor Raúl A. Vaccarezza al correcto caballero y amigo, que también me brindara todo lo que estuvo a su alcance para la mejor realización de nuestras tareas.

Esta digresión, que para mí es aparente, por cuánto lo que acabo de decir tiene relación con la tuberculosis experimental en nuestro país, lleva el fin de mi agradecimiento personal, como así también del reconocimiento que todos debemos a los Profesores Sayago y Vaccarezza por el apoyo decidido y entusiasta que han prestado y siguen prestando a la investigación de la bacteriología de la tuberculosis.

Influencia de los experimentos de Villemin sobre el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis.

La diversidad de resultados obtenidos por aquellos experimentadores que inspirados en la doctrina de Pasteur, encaminaban sus búsquedas hacia el descubrimiento del elemento animado como causa específica de la tuberculosis, lo explicaron después las particulares características del agente microbiano causante de la enfermedad. Características que hoy sólo conocemos en parte y que seguramente lo que se ignora es aún más de lo que se sabe.

La presunción de la existencia del agente específico de la tuberculosis que se tuvo mucho tiempo antes de su descubrimiento, fué indiscutiblemente consolidada por la prueba fundamental de Villemin (1865), que apareció precisamente en momentos en que Virchow y sus colaboradores con sus prolijos estudios anatómo-patológicos, hacían peligrar la causa defendida por el genial Laenec. Los experimentos del profesor de Val de Grace demostraron que era una sola la causa de los diferentes cuadros anátomos patológicos de la tuberculosis, tanto para el hombre como para los animales, especialmente para los bovinos, cuyas lesiones características, habían sido rechazadas terminantemente por Virchow como correspondientes a dicha enfermedad. Me refiero a las designadas después con el nombre de tuberculosis perlada.

Mientras otros investigadores iban comprobando la doctrina de

Villemin sobre la inoculabilidad y virulencia del material proveniente de distintas formas de tuberculosis, los opositores multiplicaban sus actividades para demostrar que en un terreno favorable, cualquier causa podía determinar lesiones semejantes, las que se podían conseguir hasta con la inyección endovenosa de finos triturados de piezas anatómicas conservadas en alcohol. Sostenían así, estos investigadores las conclusiones a que arribara Cruveilhier, cuando afirmaba que la enfermedad nada tenía de específico y que se podía reproducir en perros con la inyección intra-traqueal o endovenosa de mercurio.

La constancia y clarividencia de Villemin, hizo que nuevos experimentos le dieran el convencimiento de que la tuberculosis era producida por un elemento invisible vehiculizado por la materia tuberculosa, como la llamara Laenec, y que los adelantos de la técnica microscópica facilitarían su descubrimiento.

Entre los que comprobaron los experimentos de Villemin figuraba Conheim, inicialmente opositor y que después con Salomonsen, mediante la inoculación en la cámara anterior del ojo del conejo, tuvo resultados tan demostrativos en favor de la inoculabilidad y virulencia del material proveniente, ya de tuberculosis pulmonar como de la piel, que le permitió profetizar, tres años antes, el descubrimiento de la causa específica de la enfermedad.

DESCUBRIMIENTO DE KOCH

El talento, gran habilidad técnica y rígida disciplina científica que el mismo Koch se impusiera con sus postulados, lo llevaron sin desvíos al descubrimiento del bacilo de la tuberculosis, cuya comunicación se hizo en forma irrefutable en la sociedad de fisiología de Berlín el 24 de marzo de 1882.

La repercusión lógica de este acontecimiento, tuvo la virtud de convertir en colaboradores a casi todos los laboratorios del mundo, que no sólo comprobaron la presencia del bacilo en los distintos tipos de lesiones de la enfermedad, sino que reconocieron la justeza y utilidad de los métodos de coloración y de inoculación indicados por el descubridor.

Koch, estudió las características de las cepas de los bacilos aislados del hombre, del mono, de los bovinos y de las aves y en su memoria de 1884, se pronunció sobre la identidad de las mismas.

El error que cometiera Koch al considerar al bacilo aviar igual

al de los mamíferos, se produjo cuando él se apartó de sus propios postulados, pues sin practicar la reproducción experimental de la enfermedad mediante la inyección de material procedente de aves, ni aislar de las lesiones el germen, ni reproducir de nuevo las lesiones por la inoculación de cultivos puros del mismo, se conformó con el exámen microscópico de los preparados sometidos al método de coloración de Ehrlich,, que en aquellos momentos se consideró como suficiente para la identificación del germen.

MICROBIOLOGIA DEL BACILO

Coloración —Ehrlich, basado en la teoría de Koch, sobre la acción favorable de los álcalis para la penetración del colorante (azul de metileno) a través de la membrana del bacilo, cuya existencia fué supuesta por Koch, creyó que dicha membrana podía ser impermeable a los ácidos y a un preparado intensamente teñido por un colorante básico lo trató con ácido nítrico diluído, previendo la posibilidad que el bacilo no perdería la coloración. Y así fué como Ehrlich, descubrió la condición de ácido resistencia del bacilo de la tuberculosis.

La teoría que se llamó Koch-Ehrlich, tuvo corta vida, pues Ziehl, se encargó de demostrar que la tinción podía realizarse igualmente con colorantes acidulados con ácido acético. Ziehl no pudo explicar por qué el bacilo se teñía mejor con el líquido de Ehrlich que con el de Koch, ésto es reemplazando la potasa por el acetite de anilina o por el ácido fénico que él mismo propusiera. Tampoco pudo explicar el por qué de la descoloración que sufrían todas las demás bacterias la de Koch, al ser tratadas por diluciones de ácidos minerales. Pero ante la insistencia de Ehrlich sobre la impermeabilidad de la membrana a los ácidos, Ziehl se concretó a realizar un experimento con el que demostró bajo el microscópio la descoloración del bacilo por el tratamiento con solución de ácido nítrico y el retorno de la coloración mediante el lavado con agua.

Este mismo experimento fué repetido por nosotros cincuenta años más tarde, ante químicos y bacteriólogos, quiénes posiblemente influenciados por la creencia general de la existencia de la caparazón de cera y grasa del bacilo, ponían reparos a la interpretación del fenómeno de ácido-resistencia basada precisamente en el grado de permeabilidad de la membrana de Koch, cuya existencia teórica la confirmaban, comprobaciones de hechos observados, por Koch, Ziehl y otros.

No mencionaremos en esta exposición la gran cantidad de trabajos existentes sobre la posible explicación de la característica tintorial de las micobacterias. En publicaciones que hiciéramos en otra oportunidad (1945), figura en la cita bibliográfica la mayor parte de lo publicado hasta esa fecha, aunque después se ha continuado trabajando, lo que demuestra el interés que tiene el problema que aún está sin solución. Sin embargo, he de pedir perdón si en esta oportunidad, me referiré con algún detenimiento a la interpretación sobre el posible mecanismo de la resistencia a la descoloración como un fenómeno de membrana permeable como así lo llamara el Dr. Alfredo Sordelli. Y esto lo hago porque Houduroy, que escribe el capítulo correspondiente al tema que nos ocupa en su libro realizado con la colaboración de Chain, Florey, Jensen, Penso Trefouel y Wells, al reconocer que la teoría publicada por Sordelli y Arena, en 1934 (que él llama hipótesis) es entre las teorías físico-químicas la más consistente e ingeniosa, agrega que por ser pura hipótesis sería muy difícil aportar pruebas en su favor. No creo éste sea el momento propicio para hacer la defensa de dicha teoría, pero por lo menos deseo dejar constancia en esta exposición, que la interpretación del fenómeno de la ácido-resistencia publicada por Sordelli y Arena, no es una hipótesis desde que está basada en hechos experimentales que se pueden reproducir fácilmente, como ser: a) la pérdida de la ácido-resistencia de la masa bacilar resultante de una prolija trituración de los bacilos, tal como lo enseñara Koch; b) la pérdida de la característica tintorial de los bacilos componentes de una colonia seccionada con la navaja del micrótopo; c) el fenómeno de descoloración del bacilo por el ácido y regreso de la tintación por el lavado con agua, fenómeno que se puede apreciar macro y microscópicamente; d) la ácido-resistencia de los huevos de parásitos, condicionada por la integridad de su membrana, y por último el experimento realizado con sacos permeables (papel celofán), dentro de los cuales habíamos colocado preparados efectuados con bacterias no ácido-resistentes y agua. Los sacos fueron sumergidos con su contenido, primero en el colorante de Ziehl, lo que permitió ver como éste penetraba en el interior del saco y teñía los bacilos de Eberth; cuando el saco fué transportado a una probeta conteniendo solución de ácido nítrico al tercio, él todo tomó un color ligeramente amarillento. Observado en este momento uno de los preparados, permitió ver a los bacilos de Eberth, con el mismo tinte amarillento y cuando se transportó el saco a un vaso con agua circulante, se apreció la rápida difusión del ácido hacia el exterior reapareciendo en el interior del mismo nuevamente el color rosado,

observándose entonces que los bacilos de Eberth estaban teñidos de rojo. De estos hechos se infirió que la propiedad de la ácido-resistencia se podía explicar de la siguiente manera: se fija sobre los elementos afines del citoplasma especialmente del tipo proteico. El ácido que llega a ellos por el mismo mecanismo transforma el colorante en un complejo ácido-fucsina de color amarillento. El lavado produciría la difusión a través de la membrana en primer término del ácido quedando de nuevo el colorante fijado en el interior del bacilo.

Este experimento postula la existencia de una membrana permeable como ya se dijera entonces, cuya estructura no tendría que ser necesariamente de cera y grasa.

La teoría de la existencia de membrana con cierto grado de permeabilidad, no sólo permite dar una interpretación al fenómeno de ácido-resistencia, sino también nos puede ayudar a explicar el comportamiento semejante que tienen las microbacterias frente a otros descolorantes que no son ácidos minerales. Eberspacher, ha demostrado que el agregado de una pequeña cantidad de cloruro de sodio al alcohol, lo convierte en un activo descolorante para todas las bacterias, menos para las ácido-resistentes.

En la práctica, la diferenciación del bacilo de Koch por el método del alcohol con cloruro de sodio, ha dado resultados hemejantes a los obtenidos con otro procedimiento de descoloración. Resultados que mejoran aún como lo ha comprobado entre nosotros el Dr. Coira, si se contrasta la tintición del preparado con el Amarillo de Victoria.

No quiero dejar de transcribir en éste momento las interesantes opiniones publicadas en éste último año por Paraff y su discípulo Desbordes, sobre esta cuestión, que en cierto modo nos dan algo de razón: "La ácido-resistencia no implica como se pensaba, la existencia de una caparazón cerosa-impermeable. El bacilo tuberculoso como todo ser vivo, se comunica ampliamente con el exterior y respira con gran avidez de oxígeno, se nutre y vuelca sus productos". —Agregamos también, continúa diciendo Paraff "que las sustancias activas contra este germen, estreptomycin y ácido paramino salicílico, no tiene ninguna acción particular de disolución sobre los lípidos". — Por otra parte, la presencia de lípidos y de ciertos ácidos grasos, no es especial de los bacilos ácido-resistentes, pues la mayoría de las bacterias contienen esta sustancias.

Desbordes, en su interesante libro sobre diagnóstico de las microbacterias, pone al día todos los trabajos sobre las teorías químicas de

la ácido-resistencia y concluye que aún no se conoce cuál es la sustancia responsable del fenómeno. **Según este autor el mecanismo podría explicarse por una desigual velocidad en la descoloración**, producida por una diferencia de permeabilidad debida a la presencia de cargas eléctricas independientemente de la integridad de la cubierta. Aceptando por otra parte, que las formas no ácido-resistentes se encuentran particularmente en los cultivos jóvenes, con lo cual relacionaría el fenómeno de la ácido-resistencia más bien con la estructura de la membrana que con su integridad. Stacey, considerando el caso particular del *Mycobacterium Tuberculosis*, en el Symposium de la Sociedad de Microbiología General de Inglaterra, celebrado en Oxford en 1949, llega a la conclusión de que los bacilos ácido-resistentes son Gram positivos en los cultivos jóvenes y débilmente en otras condiciones. Y que, cuando se extrae con procedimientos muy cautelosos una buena parte de las ceras y ácidos grasos, conteniendo el material, polisacáridos y ácido deoxiribonucleico, la célula residual no es un simple esqueleto, sino que contiene abundantes proteínas básicas con carbohidratos y ácido-nucleico tipo ribosa.

En esas condiciones las bacterias así extraídas mantienen la propiedad de la ácido-resistencia haciéndose muy dudosa su Gram positividad.

Membrana del bacilo tuberculoso. - Su estructura: Poco se sabe sobre su estructura, pero todos coinciden en que es semi-impermeable y que su espesor oscila alrededor de 10 a 100 Å. La membrana crecería hacia afuera formando sobre su superficie la pared compuesta por capas amorfas que se observarían mejor en las bacterias de cultivo. La existencia de la membrana se acepta más bien por sus reacciones y sus efectos, que por su anatomía poco visible.

Por teñirse con los colorantes de las grasas solubles (el sudan) se acepta la presencia de un líquido o de un compuesto lipoteico que también existiría en otras bacterias no ácido-resistentes.

La membrana estaría ubicada entre la parte interna de la pared y el citoplasma, pero es muy difícil ponerla de manifiesto en las bacterias que no sufren plasmolisis, como es el caso de las Gram positivas.

La membrana, o mejor dicho la barrera osmótica, es difícil distinguirla de la margen externa del citoplasma en las micrografías electrónicas. En aquellos micro organismos Gram negativos con plas-

molisis, la contracción ocurre entre el cuerpo celular y la pared, dejando poca duda de que la barrera osmótica está situada en la superficie del citoplasma.

Respecto a las diferencias de permeabilidad de las bacterias, la única observación cualitativa, es justamente la que se refiere a la baja permeabilidad de la barrera osmótica del bacilo de la tuberculosis. Parece que el retardo producido por la barrera es por lo menos de un orden superior que para otros microorganismos. Es posiblemente más que una coincidencia que la micobacteria tenga generalmente una velocidad de crecimiento y un metabolismo sustancialmente menos rápido que en otras bacterias, aunque indudablemente esa permeabilidad ha de tener una relación con la edad y en consecuencia con la actividad nutritiva, cuyo proceso ha de balancear la velocidad de pérdida y de ingreso de las sustancias.

BARRERA OSMOTICA ACTIVA Y PASIVA

La permeabilidad de la membrana ha sido estudiada por determinaciones de velocidad de migración de metabolitos en las bacterias Gram positivas. Así por ejemplo el ácido glutámico pasa con determinada velocidad en las células en reposo, pero en presencia de una fuente de energía como ser la glucosa, dicha velocidad aumenta significativamente.

Esto permite aceptar un estado pasivo de la barrera que puede hacerse activo, cuando es estimulado por una fuente de energía. Este estado de actividad de la membrana está fundamentado además por el hecho de que el ácido-glutámico para llegar al interior del cuerpo celular sufre una transformación al estado de glutamina, para nuevamente aparecer en el citoplasma como ácido-glutámico.

Según Dubos, el Tween 80 en determinada concentración favorece la permeabilidad de las microbacterias y agregado a los medios de cultivos sintéticos favorece el desarrollo de las mismas.

Resumiendo, repetimos que sobre la anatomía de la membrana, poco se sabe, por hallarse en el límite de la visibilidad y que más bien se la aprecia por su función. En cambio la pared que es producción de la membrana y que es invisible con los métodos comunes de tinción, se observa en las micrografías electrónicas y también se pone en evidencia con métodos de tinción especiales. Esta pared es rígida y esta propiedad es más evidente en las micobacterias.

FALLA DE LOS METODOS BACTERIOLOGICOS ACTUALES

La desecación de los preparados, tiempo indispensable para el empleo de los métodos comunes de laboratorio, más la fijación también por el calor y la intensa coloración reforzada a su vez por la temperatura (cuando no se utilizan métodos en los que se aconseja hervir el preparado), modifica enormemente la realidad morfológica de los elementos microscópicos.

Estos procedimientos groseros, pueden continuarse usando para el trabajo de rutina, aunque no sabemos cuantas estructuras dejarán de verse por las mismas razones. Pero para estudios de investigaciones morfológicas se imponen técnicas que alteren lo menos posible las células, como lo sostienen Bisset y colaboradores de la Universidad de Birmingham. Así por ejemplo, ellos afirman que los gránulos que vemos teñidos en rojo por el método Ziehl y Neelsen, en el interior de los bacilos, que debido a la rigidez de su pared se ven dispuestos en cadena, corresponden a núcleos de células contraídas por la alta temperatura que han debido soportar durante la desecación y fijación. Estos núcleos pertenecerían a células, o mejor, a microcélulas que formarían parte de la estructura de las bacterias. Lo mismo ocurriría con los gránulos metacrómicos del bacilo diftérico, apoyando esta opinión el hecho de que éstos sólo se ven cuando se emplean los métodos de desecación y fijación citados.

Según el autor de referencia, las bacterias serían multicelulares, pudiendo las corine-bacterias y las mico-bacterias estar compuestas por una o doce células, las eubacterias por cuatro y las cocáceas por una, dos, tres o cuatro.

Las micobacterias y las corinebacterias, parecen diferenciarse mucho en su morfología de los demás bacilos. Un bacilo puede tener la forma oval y ser en ese caso una sola célula o tener la forma de bastón y contener entonces hasta doce células.

Por lo que se refiere a la multiplicación del bacilo de Koch, se haría generalmente por simple división de las células que lo componen. Esta división vegetativa puede presentarse de dos maneras que corresponderían al tipo simple y al tipo complejo.

En el simple, el crecimiento activo y rápido se iniciaría por las células centrales que se duplicarían y por división formarían dos bacilos. En la otra forma de división, por separación de las células, cada una actuaría como una unidad microbiana.

Estas dos maneras de multiplicación pueden observarse en un mismo cultivo, existiendo sin embargo cepas que tienen predilección por uno o por otro proceso.

Wykoff y Smithborn, sostienen que el período residual del *Mycobacterium Phlei*, resulta de la fragmentación del bacilo que termina por la formación de pequeños cuerpos cocoides ácidos resistentes o no, los cuales trasplantados darían de nuevo bacilos.

Pero no es fácil determinar por el material gráfico de estos investigadores si esos cuerpos cocoides corresponden a la forma vegetativa o a formas del proceso sexual que Lindgreen y Mellon han descrito. En cambio para Espersen, los gránulos que se ven libres en los cultivos, serían resultado de la lisis bacterica como la que se obtiene con antibióticos, y nada tendrían que ver con la reproducción.

El polimorfismo del bacilo tuberculoso y la interpretación de las diversas formas que aparecen por fragmentación celular explican la cantidad de trabajos que se han publicado sobre el posible ciclo evolutivo del bacilo, llegando hasta las formas filtrables. No incluyo en el posible ciclo evolutivo, el que se atribuyó a las mutaciones bruscas: pues sin negar su posible existencia en la naturaleza, lo que se ha publicado hasta la fecha en lo que se refiere al bacilo tuberculoso según nuestra opinión a infecciones accidentales de los cultivos.

Las interpretaciones de los citólogos ingleses han originado en estos últimos años controversias violentas y hasta ofensivas para los morfologistas. Sin embargo, la experiencia enseña que no se debe negar terminantemente lo que no se alcanza a ver o a comprender.

Nunca olvidaré la discusión que presencié en el Congreso de Microbiología celebrado en París en 1930, en la que el bacteriólogo más considerado por su capacidad indiscutible, terminó por decirle al descubridor del bacteriófago, que perdiese la esperanza de alcanzar a demostrar que la lisis microbiana en los cultivos se debía a un elemento figurado y sin embargo hoy el microscopio electrónico nos demuestra la presencia de dichos elementos, con la misma seguridad con que se ven las bacterias.

De todos modos, dejemos para la mayor comprobación la estructura multicelular de las bacterias y volvamos a lo que es aceptado por todos —la membrana celular, o barrera osmótica—, para decir que si me he permitido mantener la atención de ustedes con estos detalles sobre lo que aún tampoco tenemos un conocimiento acabado,

ha sido porque por lo menos, lo que se conoce admite la idea que dicha barrera osmótica activa o pasivamente influye en el metabolismo del bacilo de Koch, cuyo estudio, hoy se considera de la mayor importancia porque quizá ayude a desentrañar fenómenos relacionados con el mecanismo íntimo de las transformaciones que sufren las poblaciones microbianas puestas en contacto con los bacteriostáticos o antibióticos.

ESTREPTOMICINO-RESISTENCIA

Las limitaciones —que con cierta frecuencia se producen— de los benéficos resultados del tratamiento estreptomicínico que se liga con la resistencia de las bacterias que aparece en forma irreversible en las poblaciones microbianas, representa en la actualidad una de las mayores preocupaciones de los médicos y de los bacteriólogos que se ocupan de tuberculosis.

Afortunadamente, cuando la resistencia de la cepa, se ha hecho total y se suspende la administración de la estreptomina, los beneficios del tratamiento continúan por un tiempo más o menos prolongado, siempre y cuando el organismo mantenga sus defensas naturales, que fueron reforzadas por la infección, contra la infección misma. Este fenómeno tiene su explicación en la falta de paralelismo entre resistencia adquirida por las bacterias y la conservación de su virulencia. Ello indica que es necesario intensificar los trabajos de investigación relacionados con el aumento de las defensas orgánicas, a los efectos de dar con el producto eficaz y el momento oportuno de su aplicación, como coadyudante al tratamiento antibiótico.

Sabido es que el mantenimiento de la sensibilidad de las microbacterias o su transformación en resistentes, guarda cierta relación con la lesión tuberculosa y su localización.

Cuando se trata de experimentos en el cobayo tal como lo hicieron Vaccarezza y Cetrángolo, si se inicia el tratamiento conjuntamente a la infección tuberculosa experimental, es decir, sin que se haya aún constituido la lesión, el desarrollo de la infección experimental continúa, observándose sólo una reducción de los fenómenos de sobreinfección y alergia.

Jensen, por un parte y Steenken por otra, han demostrado que los efectos del antibiótico “invivo”, se observan a partir del momento en que aparece la alergia e inmunidad. Todo sucede según estos

autores como si la estreptomycin fuera incapaz de ejercer su actividad bacteriostática invivo sin el recurso del organismo. Mientras que no necesitaría de ninguna ayuda invitro. Esta aparente contradicción de la acción del antibiótico invivo e invitro puede explicarse, como lo sostiene Barski, porque el bacilo tuberculoso sería insensible durante su posición intracelular.

Esta circunstancia explicaría también, por qué la multiplicación del bacilo no es detenida por el antibiótico, pero no aclara porqué la multiplicación es detenida cuando el animal se hace alérgico e inmune, como lo sugieren Lina y Dubois.

Steenken, ha demostrado que en el cobayo, el tratamiento es todavía eficaz, cuando la cepa infectante contiene 0,1 % de bacilos resistentes a 1.000 gamas de antibiótico por cm³.; que la eficacia es menor cuando contiene 1 %, pero que no sería nula, aún cuando hubiera el 10 % de resistentes. No debe olvidarse que la resistencia determinada invitro no es necesariamente el fiel reflejo de la acción terapéutica del antibiótico invivo.

Por eso Gernes, Rieux, Sevin y Chenet preconizan la conveniencia de realizar el control en animales.

Las causas de este comportamiento diverso, estarían aún en discusión. Mientras unos sostienen que la estreptomycin requiere la aparición del estado alérgico para actuar sobre la bacteria, otros explican el fenómeno por el englobamiento celular que sufren los bacilos por las células del huésped infectado, dentro de las cuales se cultivarían libres de la acción del antibiótico. Este hecho nos enseñaría también el por qué es posible aislar micobacterias sensibles de organismos tratados. Y quizá serviría para explicar la recaída en los casos de meningitis que terminan por curar ante un nuevo tratamiento. En estos casos también sería de interés conocer el papel que pudiera desempeñar en la acción del antibiótico las variaciones de la glucorraquia. Hago esta referencia por la posible similitud, con el aumento de la velocidad de pasaje del ácido glutámico al interior de las bacterias en presencia de una fuente de energía como la glucosa.

El conocimiento de los distintos resultados del tratamiento, en relación con los diferentes tipos de lesiones tuberculosas, demuestra que no basta con mantener el nivel bacteriostático sanguíneo adecuado, sino que es necesario que el fármaco llegue en esa cantidad a las bacterias. La falta de irrigación o la fijación del antibiótico en par-

te por los tejidos de la lesión o por los bacilos muertos existentes en la misma, pueden ser factores coadyugantes de una aparente resistencia. En estas condiciones aquellas bacterias que tienen de por sí un cierto grado de resistencia pueden aumentarla, debido a un bloqueo parcial del sistema enzimático, relacionado con los metabolitos esenciales implicados en la acción del antibiótico. Las bacterias podrían adaptarse al antibiótico reaccionando con una mayor formación de antagonistas que contrarrestan la acción del inhibidor. Por eso, cuanto más probabilidades existan del bloqueo total del sistema enzimático de los bacilos, desde el inicio del tratamiento mediante **la asociación de antibióticos o bacteriostáticos**, como ocurre —por ejemplo— con la estreptomycinina y el ácido paraminosalicílico; menos posibilidad existirá para que las bacterias formen o aumenten su resistencia, que como es sabido la poseen en grados distintos.

SUSTITUCION DE LA POBLACION SENSIBLE POR LA RESISTENTE

La interpretación sobre el reemplazo de micobactérico sensible, por el resistente, puede atribuirse a dos causas: selección y adaptación. —De acuerdo con la teoría de Hinshelwood, la define como un proceso de mutaciones espontáneas y de alteraciones hereditarias del sistema enzimático de las bacterias en el cual el producto antibiótico ejerce la doble función de selectivo y causativo.

El estudio de la estreptomycinina-resistencia, ha revelado por otra parte, que existen otros fenómenos demostrativos de la aptitud adquirida por el bacilo para la demolición de la molécula del antibiótico. —Nos referimos al que termina por convertir a la estreptomycinina es un elemento útil y necesario para la vida misma de la micobacteria. Esta condición crea otras, que son llamadas por los autores ingleses estreptomycinina-dependiente y que Daddi y sus colaboradores llaman estreptomycinina-incitables, porque ellos sostienen que no sólo han realizado la conversión del antibiótico, en un factor necesario para la vida del bacilo, sino que esas cepas se inoculan a cobayos y a estos se los trata con estreptomycinina, la cepa adquiere para el animal de experimento un mayor poder patógeno.

CULTIVOS

Nos referiremos ahora brevemente a los cultivos invitro del bacilo de la tuberculosis, cuya técnica ha progresado hasta el grado de

que algunos autores opinan que puede sustituir en la práctica a la investigación por inoculación en cobayos. —Dada las ventajas que reportaría la implantación de la investigación por cultivos en lugar de la inoculación, hemos realizado trabajos comparativos en distintas oportunidades, y hemos encontrado siempre en conjunto un mayor porcentaje de positividad en el cobayo. —La inoculación en general puede practicarse directamente con el material a investigar; en cambio, para los cultivos, salvo raras excepciones es indispensable el tratamiento previo del material con soluciones ácidas, alcalinas o anti-sépticas, las que indudablemente tienen alguna acción perjudicial sobre las micobacterias, como lo ha demostrado entre nosotros Carlos Acuña. —Muy rara vez ocurre que un cultivo positivo se acompañe con el resultado negativo de la inoculación, pero esta posibilidad, aunque remota, nos ha hecho aconsejar en una publicación que hicieramos con Cetrángolo y la Sra. Ramírez, el empleo de los dos métodos con el mismo material.

MEDIOS NUTRITIVOS

Koch cultivó por primera vez el bacilo en suero sanguíneo coagulado. Los cultivos en este medio eran de muy escaso desarrollo, debiendo sembrarse varios tubos para poder observar algunas colonias. Además no se conocía otro método de purificación del material sospechoso que el del pasaje por el cobayo (de cuyas lesiones viscerales especialmente del bazo se debía efectuar la siembra).

La feliz modificación introducida por Nocard y Roux, que con el fin de evitar la desecación del medio nutritivo agregaron glicerina al mismo en la proporción del 5 al 8 %, tuvo un éxito que hizo época. —La glicerina no sólo actuó como higroscópico, sino también, como un elemento de alto valor nutritivo que favoreció el desarrollo tanto en los medios sólidos como en los líquidos, entre ellos el caldo glicerinado de carne de bovino con el cual se preparó la tuberculina.

La glicerina además de ser una fuente de carbono, actúa sobre la pared del bacilo, favoreciendo su permeabilidad y en consecuencia su metabolismo. Si la dosis es elevada puede actuar como bacteriostático o bactericida.

La glicerina en determinada proporción es un activante para el cultivo del bacilo tipo humano y un bacteriostático para el bovino. El bacilo bovino es mucho más sensible en sus primeros cultivos, pero cuando se adapta a ese alcohol termina por serle casi indispensable

para su crecimiento. En los primeros cultivos tolera sólo el uno o el dos por ciento, en estos casos el cultivo del bacilo bovino es característico: las colonias son de superficie lisa y de crecimiento disgónico.

MEDIOS NUTRITIVOS DE ORIGEN VEGETAL

El suero sanguíneo coagulado fué reemplazado durante un tiempo por los medios nutritivos de origen vegetal y después del cultivo en papa glicerizada obtenido por Pawlowsky, se emplearon con tal fin las hortalizas más diversas.

OTROS MEDIOS NUTRITIVOS

Pero el verdadero progreso por lo que se refiere al uso del cultivo relacionado con el diagnóstico y la higiene, se debió a la posibilidad de la siembra directa del material purificado por la destrucción química de la flora microbiana asociada y al empleo de huevos de gallina en la preparación del medio nutritivo.

Actualmente se señalan otras técnicas basadas en la utilización de los medios sintéticos que fueron el ideal de Pasteur para el cultivo de las bacterias en general, por cuanto su composición definida permitía obtener resultados más constantes.

Las primeras fórmulas para el cultivo del bacilo de la tuberculosis se deben a Kuhne, Prodkauer y Beck, derivando de ellos todo lo demás preconizado por diversos autores y que con el agregado de sustancias orgánicas, especialmente suero sanguíneo o fracciones proteicas del mismo, constituyen lo que podríamos llamar medios mixtos.

El agregado del Tween 80 a este tipo de medio que hiciera Dubois, ha permitido por las modificaciones físico químicas del mismo, la obtención de cultivos homogéneos por otras técnicas. La mayor permeabilidad de la membrana del bacilo en este cultivo lo hace inadecuado para la determinación de la estreptomicina resistencia, por cuanto las bacterias pueden aparecer con mayor sensibilidad al antibiótico de la que presentan las mismas en el organismo o en otros medios de cultivo.

INFECCION Y SOBREINFECCION EXPERIMENTALES

La inoculación en animales se hace con diferentes fines y en consecuencia debemos analizar por separado el uso debido de la vía de inoculación y la especie animal empleado.

Para el diagnóstico y la investigación del bacilo tuberculoso relacionada con la higiene, debemos seguir utilizando la inoculación subcutánea en el cobayo, que por su sensibilidad y fácil manejo resulta el animal de elección.

Para el dosaje de virulencia, dada la escasa cantidad de líquido de la emulsión que conviene emplear, la utilización del método de Ninni (inyección intraganglionar), nos parece la más indicada. —En el caso de bacilos muy virulentos, convendrá completar el estudio en animales más resistentes, como ser el conejo cuya inoculación puede realizarse por vía endovenosa, intraperitoneal, o subdural, como se aconseja para la tipificación de cepas. —Últimamente también se ha indicado con aquel fin el ratón blanco.

FENOMENOS DE CHARRIM — FENOMENOS DE KOCH

A los tres años del descubrimiento del bacilo, Charrim realizó experimentos de autoinoculaciones y reinoculaciones en el cobayo tuberculoso. En las sobreinfecciones efectuadas con material, proveniente del mismo animal o de otro origen, obtuvo la formación de una nueva ulceración semejante a la de primo-infección. —Estos resultados experimentales contribuyeron para que el investigador citado atribuyese a las ulceraciones de la tráquea y de la laringe el mecanismo de una autoinoculación en terreno tuberculoso.

Posteriormente Koch, empleando en determinadas condiciones cultivos vivos o muertos, realizó en el cobayo el experimento fundamental que se llamó Fenómeno de Koch.

Koch, dedujo que los bacilos de la segunda inoculación se eliminarían conjuntamente con la escara producida en el sitio de la misma, que los ganglios regionales no sufrirían mayor repercusión y que la lesión cutánea curaría sin defecto.

Roemer, ensayó sobre las infecciones que denominó infecciones adicionales y a pesar de haber usado bacilos de cultivo como asimismo material bacilífero provenientes de lesiones, no consiguió el resultado que obtuviera Koch. Esto motivó el aplazamiento de la importancia, que posteriormente muchos investigadores asignaron con razón al experimento de Koch, cuya reproducción se conseguía mediante la observación de condiciones que para tal fin se requieren.

El fenómeno de Koch típico, se obtiene siempre en el cobayo cuando se practica con cultivos de un mes, y en cantidad suficiente,

en un animal que haya alcanzado el elevado grado de sensibilidad que determina la primo-infección. La cantidad de bacilos debe ser por lo menos de un décimo de milígramo, con lo que se logra la enérgica reacción cutánea que lo caracteriza, sobre todo si la inyección se ha efectuado por vía intradérmica.

La disgregación "in situ" de una gran parte de los bacilos de la segunda inoculación, pone en libertad sustancias que actúan de manera semejante a una concentración fuerte de tuberculina. Entre las doce y cuarenta y ocho horas aparece una intensa inflamación de la piel del tipo hemorrágico necrótico, formándose después una escara que se elimina en un tiempo variable.

Mientras tanto muchos bacilos de esa sobreinfección —como lo demostró Boquet— mantienen su vitalidad en el lugar durante un tiempo más o menos prolongado de acuerdo a las defensas del animal en experimento. Esta vitalidad está en relación con el tiempo transcurrido entre la primo-infección y la provocación del fenómeno. La llegada de estos bacilos a los ganglios regionales y las lesiones que ellos constituyen después, dependen del estado inmuno biológico del cobayo.

Durante los experimentos de comprobación que realizáramos con los doctores José Gómez y Angel Brisco Capurro, relacionados con los trabajos de Koch, Roemer, Boquet, Toyoda y otros, pudimos apreciar que cobayos en los que se había obtenido el fenómeno de Koch típico, cuando se les sometía a un tiempo prolongado de observación (3 meses aproximadamente), presentaban una adenitis de la región correspondiente al lugar donde se había obtenido el fenómeno acompañándose con una lesión cutánea. Este complejo cutáneo ganglionar se diferenciaba del primario por su mejor intensidad. Otros animales en los que se apreciaba únicamente un aumento de volumen ganglionar y cuya lesión cutánea aparecía cicatrizada, observamos una particular fragilidad de la piel, bastando una simple tracción para provocar de nuevo una herida.

Los conocimientos actuales sobre el fenómeno de Koch que como sabemos orientó al autor hacia el descubrimiento de la tuberculina debido a las reacciones de orden general que se producían en el animal sobreinfectado, conducen a interpretar el mecanismo del mismo, como debido a dos estados: el de sensibilización que se caracteriza por la reacción cutánea de tipo alérgico tuberculinico y el de resistencia por el retardo en la dispersión de los bacilos de sobreinfección

y por el tipo de lesión ganglionar que se produce.

El fenómeno de Koch, es un síndrome con características propias y su nombre se debe reservar para referirse exclusivamente al que se obtenga con las características observadas en el cobayo.

Cuando se emplea en la sobreinfección material proveniente de lesiones tuberculosas, el fenómeno de Koch no se obtiene, sólo se consigue el fenómeno de Charrim.

Toyoda y colaboradores, atribuyeron esos resultados negativos a una posible mayor resistencia que tendrían los bacilos provenientes de las lesiones, frente a las defensas del organismo tuberculoso.

Con Gómez y Brisco Capurro, observamos que los bacilos provenientes de lesiones formaban en realidad un segundo complejo, pero nuestros experimentos de control, no nos permitieron atribuir ese resultado a una mayor resistencia de los bacilos a la "bactericidia" como la llamaron los autores japoneses. Este particular comportamiento se podría obtener con bacilos de cultivos con el agregado de tejido de animales sanos.

Además, es muy posible que la relación entre bacilos vivos y muertos sea muy diferente entre la emulsión proveniente de cultivos y la de los bacilos tuberculosos provenientes de lesiones.

DISPERSION BACILAR EXPERIMENTAL

Las investigaciones que con tanto acierto efectuara nuestro inolvidable amigo Alfredo Boquet, sobre dispersión bacilar en animales primo y sobreinfectados, no sólo le hizo llegar a claras conclusiones sobre la patogenia de las generalizaciones y a un mejor conocimiento sobre las bacteriemias, sino que también esos estudios han dejado enseñanzas que repercutieron sobre problemas relacionados con la higiene y la economía, como ser, el destino de la carne de animales tuberculosos, cuya peligrosidad está únicamente relacionada con el estado bacteriémico que pueda diagnosticarse por el cuadro anátomo-patológico. Por otra parte, estos conocimientos permiten utilizar para el consumo la carne de animales portadores de lesiones crónicas en cuya sangre, en el 100 % de los casos, no ha sido posible encontrar el bacilo de la tuberculosis.

Estas derivaciones prácticas de los estudios experimentales, han de permitir aprovechar grandes cantidades de carnes que aún se de-

comisan en nuestro país debido a las reglamentaciones anticuadas. Algunas cifras que he podido obtener de los comisos realizados en los frigoríficos bajo en control nacional, nos demuestran que se inutilizan indebidamente más de once millones de kilos por año. Sin contar todo lo que se desecha por la llamada tuberculosis localizada en los demás mataderos del país.

PASES EN SERIE

Los pases en serie por inoculación sucesiva a cobayos sanos con triturados de órganos, con lesiones atípicas en las que es difícil revelar bacilos, permiten obtener la enfermedad típica en el cobayo, en presencia de bacilos tuberculosos con un número de pases que oscila entre dos y cinco.

Esta técnica nos ha permitido confirmar la presencia del bacilo de Koch en el eritema nudoso que puede encontrarse en la piel en distintos estados de bacteriólisis, el que está en relación con el tiempo de evolución del mismo.

DIFERENCIACION DE CEPAS MEDIANTE LA INOCULACION

El animal más indicado para la diferenciación de cepas es el conejo. La inyección subdural endovenosa o intrapleural, de mínimas cantidades de bacilos (un centésimo de milígramo) provenientes del primer cultivo original, permiten diferenciar bacilos humanos y bovinos.

Respecto a las cepas atípicas que con frecuencia se aíslan del hombre tuberculoso, a nuestro entender, debemos interpretarlas como cepas de origen bovino en adaptación al organismo humano o como cepas mixtas, es decir constituidas por mezclas debidas a sobreinfecciones exógenas.

Nosotros hemos obtenido con Cetrángolo por atenuación de cepas de bacilos de bovinos típicos, desde el tipo intermedio hasta aquel cuyas características no se diferenciaban del bacilo humano. Hoy en realidad no es problema de mayor importancia la clasificación de las cepas, pues se acepta el origen único de los dos tipos de bacilos, cuyas diferencias se interpretan como fenómenos de adaptación. Además, como el bacilo bovino es más virulento que el humano para todas las especies y se le encuentra como agente patógeno en los animales más resistentes. La tuberculosis de los bovinos ha de combatirse por todos

los medios sin necesidad de nuevas tipificaciones, si se quiere llegar a los mejores resultados en la lucha antituberculosa para la especie humana.

OTROS ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Cuando ha sido necesario realizar experimentos de infección y de inmunidad cuyas condiciones debían acercarse más a lo que ocurren en el hombre, con el agregado también de obtener lesiones más semejantes, se emplearon los bovinos, dadas las dificultades de la utilización de los monos superiores.

Calmette y Guérin, pudieron con el empleo de bovinos, demostrar la propiedad inmunizante del B.C.G., contra la infección natural de la tuberculosis por cohabitación. Con el uso de pequeños animales de laboratorio, hubiera sido muy difícil llegar a los resultados de premunición que indicaran la posibilidad de utilizar ese medio preventivo para la especie humana.

La situación creada por la terapéutica actual hace sentir cada vez más la necesidad de la experimentación en la especie animal que ofrezca mayor similitud con la enfermedad del hombre, lo que no se obtiene con los pequeños animales de laboratorio, que en cambio son tan útiles para el diagnóstico.

Creo, como lo insistiera Ascoli en el 1er. Congreso del BCG en París, que el bovino ofrece el cuadro anátomo patológico más parecido al del hombre y que el uso de ese animal de experimento debiera ser de preferencia. No cabe duda que los estudios sobre inmunidad realizados así lo demuestran y que los experimentos podrían extenderse en esa especie a la fisiopatología y ensayos terapéuticos.

La especie caprina nos ha resultado muy útil en la demostración de la actividad de la vacuna antituberculosa de Calmette y Guérin. Pero no podemos decir que pueda reemplazar a la bovina por cuanto no existe un estudio comparativo de la enfermedad entre las dos especies. En el experimento realizado con R. Schwartz en el Instituto de Tisiología que dirigiera el Profesor Sayago, demostramos claramente el poder de resistencia que determina la vacuna en los cabritos recién nacidos que nos facilitara un distinguido tisiólogo, ejemplo de trabajo honesto y de bondad, cuyo respetuoso recuerdo tenemos, me refiero al maestro Antonio Cetrángolo. Por otra parte hemos observado en nuestro experimento lesiones de tuberculosis crónica muy semejantes a las de los bovinos, sin creernos por eso autorizados para

proponer por ahora el reemplazo de una especie por la otra. Sería necesario primero el estudio comparativo a que me he referido.

Para estudiar la primó infección del aparato digestivo, formas de generalización aguda, precoz o tardía, el animal más indicado sería el cerdo, por ser éste uno de los más receptivos a la infección tuberculosa como lo prueba el hecho de que se enferma naturalmente con las tres cepas, la bovina, la humana y la aviar. —Con esta última que es la menos virulenta para cobayos, bovinos y caprinos, se obtiene un cuadro anátomo-patológico de tipo productivo tan característico que basta observar las lesiones sarcoides para diagnosticar la infección por bacilo aviar.

Otra especie que podría ser útil para ciertos estudios experimentales de la tuberculosis es la equina.

En la tuberculosis del caballo predominan las lesiones de tipo productivo. El aspecto lardaceo de algunos cuadros anátomo-patológicos cuya etiología tuberculosa se ignoró por mucho tiempo hicieron que se atribuyese a este animal más resistencia a la infección natural de la que en realidad tiene. La proporción de animales tuberculosos observada en los mataderos europeos es de 1 X 10 mil.

Dado el escaso porciento de tuberculosis en el caballo que vive en las mismas condiciones que el bovino, es lógico pensar que esta especie tiene mucha mayor resistencia a la infección natural. Sin embargo, experimentalmente el equino se infecta como el cerdo con las tres cepas y es muy sensible a la enfermedad experimental con cepas alternadas, como tuvimos ocasión de comprobarlo en el Instituto Pasteur inoculando el BCG por vía venosa. Este hecho, de apariencia paradójal, debiera ser motivo de investigaciones conducentes a explicar por qué una especie tan receptiva a la infección experimental, resulta tan resistente a la infección natural.

Señores —Si con esta exposición he llegado a cansarlos con hechos conocidos, con explicaciones teóricas o con sugerencias de trabajos experimentales, más fáciles de enunciar que de realizar, pidoles perdón, pero he de confesar que al sugerir investigaciones complementarias he perseguido un sólo fin: el de hacer resaltar la necesidad de la creación de un Instituto destinado al estudio de la tuberculosis experimental con más medios de los que cuentan los existentes. Ese Instituto si fuera posible, debiera ser sostenido por la acción privada, bajo el patrocinio y dirección administrativa de una comisión permanente

designada por las Sociedades Argentinas de Tisiología. Así contribuiría nuestro país con los demás laboratorios del mundo, a la dominación definitiva de uno de los mayores peligros para la salud del hombre y de los animales. Pues, si bien es cierto que el bacilo de la tuberculosis es un enemigo que marcha en retirada, no olvidemos que esa retirada es defendida por la misma naturaleza, que en su afán de mantener el equilibrio biológico, pone en juego sus fuerzas de selección y adaptación, (tanto para el huésped como para la bacteria), que si bien es cierto puede permitir la conquista de un estado simbiótico, cada vez más firme, no deja de estar sujeto a variaciones que siempre significan un peligro para el huésped.

Afortunadamente la acción médico-social que con tenacidad e inteligencia aplica los conocimientos consagrados por la experimentación para la prevención y curación de la tuberculosis, tiene en sus manos un arma, que permite la creación de ese estado simbiótico necesario para la premunición: una micobacteria de propiedades fijas y conocidas, que aumentan y mantienen las defensas naturales del organismo, sin ningún riesgo, me refiero señores, al BCG que nos diera el brillante equipo del Instituto Pasteur, encabezado por un médico y un veterinario: Calmette y Guérin.—

NOTA COMPLEMENTARIA (1)

Las modificaciones de orden biológico que suele presentar el bacilo tuberculoso sometido a la acción de los antibióticos, tanto en el organismo, como en el tubo de cultivo, han abierto un amplio campo a la bacteriología de la tuberculosis.

Las consecuencias que puedan tener las modificaciones aludidas con respecto a la enfermedad tuberculosis del futuro, son todavía difíciles de prever. —De todas maneras, el nuevo capítulo de la bacteriología, que se ha iniciado hace ya aproximadamente diez años, se irá engrosando con nuevas observaciones e investigaciones, cuyos resultados ayudarán a interpretar y resolver los problemas que ofrezca el empleo de dichas drogas, que desde ya representa un gran beneficio para los enfermos, con la consiguiente repercusión en la disminución de la mortalidad por tuberculosis.

RESISTENCIA

La aparición de la resistencia vital, que presentan frente a los antibióticos o bacteriostáticos, algunas cepas o bacilos que forman parte de ellas, han sido desde un principio y continúan siendo aún motivo de realización de importantes trabajos de investigación. —A ellos nos hemos referido en la conferencia sobre "Tuberculosis Experimental" dada en el Tercer Congreso Argentino de Tisiología, realizado en Rosario en Octubre de 1951, de la que hicimos en noviembre del mismo año una información a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. —En aquella oportunidad, nos ocupamos también de los posibles motivos de los diferentes resultados que se observan en los tratamientos, con relación a los diferentes tipos de lesiones tuberculosas, por cuanto estas podían influir como causa de la resistencia adquirida por los bacilos, a los cuales no llegase el antibiótico en la cantidad su-

(1) Arena, A. R. — Noviembre de 1958.

ficiente, ya fuese por falta de irrigación; por fijación de la droga por parte de los tejidos de la lesión; por bacilos muertos y (agregamos ahora) o por la flora microbiana asociada. —Cualquiera de estas causas, podrían actuar como coadyuvantes favoreciendo la adaptación de los bacilos, mediante la formación de sustancias antagónicas correspondientes.

Por eso decíamos, que cuanto más probabilidades existiesen en realizar un rápido y mayor bloqueo del sistema enzimático de los bacilos, desde el comienzo del tratamiento con antibióticos y sobre todo asociados, como ya se había observado con la estreptomycina y ácido paramico salicílico (P. A. S.), seguramente se obtendría menor formación de bacilos resistentes.

Los trabajos publicados desde aquella fecha hasta el presente, ya sea sobre “resistencia” u otros motivos relacionados con la acción de los antibióticos, han sido muchos y muy importantes, tanto en el extranjero como en nuestro país, contándose entre estos últimos los realizados por Cetrángolo (bacteriólogo) y Croxate (anatomopatólogo) en los laboratorios de la cátedra de tuberculosis que dirige el Profesor doctor Raúl F. Vaccarezza. Y aunque no se haya dado la última palabra sobre el mecanismo íntimo, de la aparición o acrecentamiento de la resistencia del bacilo de Koch, al antibiótico empleado en determinadas dosis, por lo pronto, ha quedado bien establecido el beneficio de la terapéutica por los antibióticos asociados. Se cuentan a este respecto trabajos muy importantes, como los dados a conocer por el Medical Research Council, cuyos mejores resultados corresponden a las asociaciones de antibióticos o bacteriostáticos en cuya fórmula predomina la Isoniacida.

SENSIBILIDAD

Una de las consecuencias de orden práctico provocada por el uso de los antibióticos en tuberculosis, ha sido la modificación de la valoración que se adjudicaba a los métodos de laboratorio confirmativos del bacilífero. —Recordemos que dicha valoración se hacía de acuerdo a la sensibilidad de cada método, que en orden creciente era: la observación microscópica, el cultivo y la inoculación, adjudicándose a los resultados negativos de este último, convenientemente repetido, un valor decisivo. —En cambio, en la actualidad cuando el material procede de enfermos tratados con antibióticos, el orden del valor de los tres métodos puede variar. —Sin entrar al detalle de las múltiples

causas que pueden influir sobre la mayor o menor sensibilidad que adquieran los bacilos bajo la acción de los antibióticos y que abordando el problema desde el punto de vista práctico, recordaremos que el porcentaje de la negatividad de los cultivos, puede también estar influenciado por el método de purificación del material antes de la siembra, pues, se ha comprobado que el bacilo que proviene de enfermos tratados con antibióticos, presenta menos resistencia a las sustancias químicas que entran en la composición de las soluciones purificadoras, que el bacilo de los enfermos que no han sido sometidos a dicho tratamiento. —Esa comprobación pudiera también servir para explicar las mínimas o tardías lesiones o los resultados negativos de las inoculaciones, aunque no se hiciese sufrir la acción purificadora al material que se inyecta, pues, la disminución de resistencia de los bacilos, puede no permitirle vencer en la lucha que éstos deben sostener con las defensas del organismo.

La consecuencia que se sacaría, colocándose en el caso extremo de la persistencia del bacilo en el examen microscópico con reiteradas inoculaciones negativas, sería la de considerar positiva la investigación del bacilo tuberculoso y no como lo hubieramos hecho antes de la época del uso de los antibióticos, en que la sola presencia de bacilos ácidos resistentes en el examen directo, con repetidas inoculaciones y cultivos negativos nos hacía sospechar más bien en la presencia de una microbacteria saprofita o muerta.

QUIMIO-PROFILAXIS

La llamada “quimio-profilaxis”, corresponde al uso del antibiótico en los casos libres de infección o de enfermedad, que se ven obligados a convivir en un ambiente infectado.

Los resultados conseguidos con este procedimiento son ya promisorios, esperándose que dicho método represente una nueva arma para la lucha contra la enfermedad. —Muchos son los trabajos de investigación realizados hasta la fecha y últimamente (septiembre de 1958) Canetti, Bretay y colaboradores, han publicado experimentos tendientes a la apreciación del poder inmunizante del B.C.G. Standard en cobayos sometidos al tratamiento con Isoniacida desde el momento de la vacunación y mantenido durante un tiempo prolongado.

Los animales fueron vacunados con la dosis que se emplea para el hombre por vía intradérmica.

La diferencia entre los grupos vacunados y tratados con Isoniacida y los vacunados sin haber sido sometidos al antibiótico fué grande.

El tratamiento precoz por Isoniacida en cobayos vacunados con dosis de B.C.G. como la que se emplea por vía intradérmica en el hombre, impidió la aparición de la alergia y de la inmunidad.

En cambio, en el lote de cobayos solamente vacunados con la dosis mencionada, o sea sin tratamiento con Isoniacida, la alergia y la inmunidad ha sido semejante a la que presentan los cobayos vacunados con dosis mayores de B.C.G.

En consecuencia, el tratamiento precoz con Isoniacida en los cobayos vacunados con la dosis indicada de B.C.G., tiene un efecto negativo.

Otros experimentos realizados con el B.C.G. Standard y con el B.C.G. izoniacida resistente, han demostrado para ambas cepas un poder alergénico e inmunizante parecidos, siendo algo favorable el de los vacunados con B.C.G. Isoniacida resistente.

En las aplicaciones efectuadas en el hombre, se han obtenido resultados semejantes a la de los cobayos.

En consecuencia, Canetti y colaboradores aconsejan que en casos en que las circunstancias epidemiológicas exigieren la práctica de la vacunación simultánea con la Quimio-profilaxis, debe darse preferencia a la vacuna con B. C. G. Isoniacida resistente.

Al terminar esta limitada ampliación de mi informe, debo manifestar que con ello, no pretendo hacer una puesta al día sobre Tuberculosis Experimental, sobre la cual se ha trabajado tanto durante estos últimos siete años, sino que sólo he deseado referirme someramente a lo mucho que se ha progresado en el campo de la investigación sobre la nueva bacteriología de la tuberculosis originada por el empleo de los antibióticos o bacteriostáticos.